

Aus dem Pharmakologischen Institut der

Johannes Gutenberg Universität Mainz

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. E. Muscholl

**ÜBER DEN EINFLUSS VON MONOVALENTEN
KATIONEN UND BISGUANYLHYDRAZONEN AUF
DIE WECHSELWIRKUNG VON
CALCIUMIONEN MIT RIBONUKLEINSÄURE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

VOLKER MICHAEL KARLHEINZ MARTYNUS

aus Breslau

1974

Mainz 1973

Aus dem Pharmakologischen Institut der

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. E. Muscholl

**ÜBER DEN EINFLUSS VON MONOVALENTEN
KATIONEN UND BISGUANYLHYDRAZONEN AUF
DIE WECHSELWIRKUNG VON
CALCIUMIONEN MIT RIBONUKLEINSÄURE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

VOLKER MICHAEL KARLHEINZ MARTYNUS

aus Breslau

Mainz 1973



Fachbereichsdekan :

Prof. Dr. P. Klein

Referent :

Prof. Dr. U. Wollert

Korreferent :

Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Tag der mündlichen Prüfung : 18. Dezember 1974

Meinen Eltern

in

Dankbarkeit

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Methodik	3
1. Substanzen, die auf ihre Wechselwirkung mit Ribonukleinsäure geprüft wurden	3
2. Vordialyse der Ribonukleinsäure	3
3. Bestimmung der Bestandteile und Charak- terisierung der Lösungen	4
4. Substanz-Ribonukleinsäure-Lösungen	4
5. Substanz-Stammlösungen	5
a) Calciumchlorid	5
b) Natriumchlorid	5
c) Kaliumchlorid	6
d) Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon- dichlorid BG 31	6
e) 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenyl- bisguanylhydrazondichlorid BG 60	6
6. Quantitative Bestimmung der Wechsel- wirkung (Gleichgewichtsdialyse)	6
7. Bestimmung der Calciumkonzentration	7
8. Einfluß von Kaliumchlorid, Natriumchlo- rid, BG 31 und BG 60 auf die Wechselwir- kung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure	11
9. Charakterisierung der Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure	11
10. Statistische Methoden	12

	Seite
III. Versuchsergebnisse	15
1. Der prozentuale Anteil α an freier Substanz bei Gleichgewichtsdialyse	15
a) Calciumionen und Ribonukleinsäure	15
b) Einfluß von Kaliumchlorid auf die Calciumionen-Bindung an RNS	16
c) Einfluß von Natriumchlorid auf die Calciumionen-Bindung an RNS	17
d) Einfluß von BG 31 auf die Calcium- ionen-Bindung an RNS	18
e) Einfluß von BG 60 auf die Calcium- ionen-Bindung an RNS	19
2. Weitere Charakterisierung der Bindung von Calciumionen an die RNS	25
IV. Diskussion	42
V. Zusammenfassung	49
VI. Literaturverzeichnis	51
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Mehrere Autoren haben von der herzoglykosidartigen Wirkung verschiedener Bisguanylhydrazone berichtet (Kroneberg u. Stoepel, 1964; Greeff et al., 1964; Ehmer et al., 1964 a, b; Dransfeld et al., 1967).

Die Wirkung der Bisguanylhydrazone im Tierversuch ähnelt der, der Herzglykoside - sie zeigt eine Steigerung der Kontraktionsamplitude der Herzmuskulatur und in hohen Konzentrationen am Herzmuskel eine Kontraktur. Bisguanylhydrazone beeinflussen den Natrium-, Kalium- und Calciumstoffwechsel und das Membranverhalten der Herzmuskelzelle wie die Digitalissubstanzen (Dransfeld u. Greeff, 1964; Wollert, 1969).

Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, daß Digitalisglykoside die ionisierte Calcium-Fraktion in der Zelle erhöhen (Lüllmann u. Holland, 1962; Klaus u. Kuschinsky, 1962; Grossman u. Furchgott, 1964). Die Autoren nehmen an, daß Digitalisglykoside die intrazelluläre Bindung der Calcium-Ionen hemmen, so daß mehr ionisiertes Calcium für die Aktivierung der Myofibrillen-ATPase zur Verfügung steht.

Weiterhin wurde festgestellt, daß eine Anreicherung sowohl einiger Herzglykoside (Dutta et al., 1968; Gerber et al., 1968) als auch einiger Bisguanylhydrazone (Hofmann u. Wollert, 1969 c) in der mikrosomalen Fraktion

des Herzmuskels stattfindet. Möglicherweise ist diese Anreicherung in der mikrosomalen Fraktion für die Wirkung von Bedeutung (Dutta et al., 1968; Gerber et al., 1968; Chipperfield u. Nayler, 1969).

Franke (1971) und Franke u. Wollert (1972) zeigten, daß bei der Anreicherung der Herzglykoside in der mikrosomalen Fraktion des Herzmuskels die cardiale Ribonukleinsäure wahrscheinlich keine Rolle spielt, während Riechert u. Wollert (1971 a) für die Bisguanylhydrazone eine sehr starke Bindung an Hefe-Ribonukleinsäure feststellten. Damit scheint der Ribonukleinsäure bei der Anreicherung der Bisguanylhydrazone in der mikrosomalen Fraktion des Herzens eine wichtige Rolle zuzukommen.

Wir wollen mit der vorliegenden Arbeit prüfen, ob monovalente Kationen und herzoglykosidartig wirkende Bisguanylhydrazone Calciumionen aus ihrer Bindung an Ribonukleinsäure verdrängen können.

II. METHODIK

1. Substanzen, die auf ihre Wechselwirkung mit Ribonukleinsäure geprüft wurden

Die Wechselwirkungen zwischen Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a., Firma Merck Darmstadt, Nr. 2382) und Ribonukleinsäure aus Hefe (Hefe-RNS) (Firma Boehringer Mannheim, Nr. 15332) wurden allein und unter dem Einfluß folgender Substanzen untersucht:

Kaliumchlorid p.a. (KCl , Firma Merck Darmstadt, Nr. 4936)

Natriumchlorid p.a. (NaCl , Firma Merck Darmstadt, Nr. 6404)

* Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon-dichlorid BG 31

* 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenyl-bisguanylhydrazon-dichlorid BG 60

2. Vordialyse der Ribonukleinsäure

Zur Vordialyse der Hefe-RNS wurden 3,6 g RNS in 200 ml 0,2 M Trispufferlösung (Trishydroxymethylaminomethan p.a. Firma Merck Darmstadt, Nr. 8382) pH 7,40 gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung potentiometrisch kontrolliert und mit 1N Natronlauge bzw. 1N Salzsäure auf pH 7,40 eingestellt. Die RNS-Lösung wurde 4 Tage gegen

* BG 31 und BG 60 wurden im Pharmazeutischen Institut der Universität Mainz synthetisiert.

4 l 0,2 M Trispufferlösung pH 7,40 bei $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ dialysiert (Riechert u. Wollert, 1971 a) um niedermolekulare Anteile zu entfernen (Visking-Dialysierschlauch, Firma, Serva Heidelberg, Nr. 44110,15 - 20 Å). Die Trispufferlösung wurde alle 24 Stunden erneuert und die 200 ml 3,6 %ige RNS-Lösung insgesamt gegen 16 l Pufferlösung dialysiert.

3. Bestimmung der Bestandteile und Charakterisierung der Lösungen

Nach der Vordialyse wurde die Konzentration der RNS in der Lösung nach der Methode von Lin u. Schjeide (1969) bestimmt. Die Extinktionen wurden mit einem Micro-Sample-Spectrophotometer 300-N (Firma Gilford) bei 666 nm gemessen. Durch Verdünnung mit 0,2 molarer Trispufferlösung pH 7,40 wurde eine 0,5 %ige RNS-Lösung hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde potentiometrisch kontrolliert und gegebenenfalls mit 1N Salzsäure bzw. 1N Natronlauge korrigiert. Alle Bindungsversuche wurden mit derart vordialysierter 0,5 %iger RNS-Lösung durchgeführt, die bei $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ nicht länger als 3 Tage nach Beendigung der Vordialyse aufbewahrt wurde.

4. Substanz-RNS-Lösungen

Zuerst wurde die Wechselwirkung von Calciumchlorid (CaCl_2 $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$, 10^{-4}M , $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, 10^{-3}M) mit 0,5 %iger RNS-Lösung untersucht.

In weiteren Versuchen wurde der Ca^{2+} -RNS-Lösung folgende Substanzen in steigenden Konzentrationen zugesetzt:

KCl	10^{-5}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M
NaCl	10^{-5}M , 10^{-4}M , 10^{-3}M
BG 31	10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M
BG 60	10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M , 10^{-4}M

5. Substanz-Stammlösungen

Stammlösungen wurden in solchen Konzentrationen hergestellt, daß ein möglichst geringes Volumen (maximal 0,5ml/25ml) zur Erstellung der Versuchslösung in die vordialysierte 0,5 %ige RNS-Lösung pipettiert werden mußte.

Alle Stammlösungen wurden in Plastikflaschen mit Schraubverschluß aufbewahrt.

- a) Calciumchlorid: $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ p.a., Molekulargewicht von 147,02 (Firma Merck Darmstadt, Nr. 2382)

Es wurde eine $5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ CaCl_2 -Lösung in Aq.bidest. angesetzt, aus der Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt wurden:

10^{-3}M , $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$, 10^{-4}M und $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$

- b) Natriumchlorid: NaCl p.a., Molekulargewicht von 58,44 (Firma Merck Darmstadt, Nr. 6404)

Es wurden eine $5 \cdot 10^{-2}\text{M}$ und eine 10^{-3}M NaCl-Lösung in Aq.bidest. angesetzt, aus denen Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt wurden:

10^{-3}M , 10^{-4}M und 10^{-5}M

c) Kaliumchlorid: KCl p.a., Molekulargewicht

von 74,56 (Firma Merck Darmstadt, Nr. 4936)

Es wurden eine $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ und eine 10^{-3}M KCl-Lösung

in Aq. bidest. angesetzt, aus denen Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt wurden:

10^{-3}M , 10^{-4}M und 10^{-5}M

d) BG 31: Molekulargewicht von 436,5

Es wurde eine $2 \cdot 10^{-3} \text{M}$ BG 31-Lösung in Aq. bidest.

angesetzt, da BG 31 in höherer Konzentration nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte. Hieraus

wurden eine 10^{-4}M und eine 10^{-5}M BG 31-Lösung hergestellt.

Weiterhin wurde eine $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ BG 31-Lösung in

Aq. bidest. angesetzt aus der Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt wurden:

10^{-6}M und 10^{-7}M

e) BG 60: Molekulargewicht von 451,4

Es wurden eine $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ und eine $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ BG 60-

Lösung in Aq. bidest. angesetzt, aus denen Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt wurden:

10^{-4}M , 10^{-5}M , 10^{-6}M und 10^{-7}M

6. Quantitative Bestimmung der Wechselwirkung

Die Bindung der Calciumionen an RNS wurde mit Hilfe der

Dialysemethode (Krieglstein u. Kuschinsky, 1968; Riechert u. Wollert, 1971 a) bestimmt.

Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (22°C) und über einen Zeitraum von 16 Stunden durchgeführt.

5 ml einer Substanz-RNS-Lösung wurden in Visking-Dialysierschläuche (Firma Serva Heidelberg, Nr. 44104, 15 - 20 Å) gefüllt und die einzelnen Säckchen von 7 mm Breite in Glasröhrchen von 8 mm lichter Weite, die 5 ml 0,2 M Trispufferlösung pH 7,40 enthielten, maschinell auf und ab bewegt (16 Std., 22°C). Danach wurde die Calciumkonzentration in den Dialysesäckchen und in der Pufferlösung bestimmt.

7. Bestimmung der Calciumkonzentration

Nach Beendigung der Dialyse wurden aus der Pufferlösung jeweils 1,0 ml und aus den Dialysesäckchen jeweils 0,5 ml entnommen. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Proben wurden in einem elektrisch beheizten Aluminiumblock bei 80°C eingedampft. Die eingedampften Proben wurden jeweils mit 0,2 ml Veraschungsgemisch, das aus gleichen Teilen Perchlorsäure (p.a., etwa 70 %ig, Firma Merck Darmstadt, Nr. 519) und Salpetersäure (p.a., mindestens 65 %ig, Firma Merck Darmstadt, Nr. 454) besteht, nach der Methode von von Hattingberg et al. (1966) feucht verascht. Die Veraschungsrückstände wurden in 1,0 ml N/10 Salzsäure aufgelöst und mit 1,5 ml 1 %iger Lanthanchloridlösung (mit N/10 HCl, in Aq.bidest. angesetzt) aufgefüllt.

Eichkurvenwerte: Sie wurden aus einer $5\text{ }\mu\text{M}$ Calciumchloridlösung/ml für den Bereich von $0,05 - 0,5\text{ }\mu\text{M}$ CaCl_2 /ml hergestellt und ebenfalls mit 1 %iger Lanthanchloridlösung aufgefüllt.

Leerwerte: Die veraschte $0,2\text{ M}$ Trispufferlösung wurde wie oben beschrieben behandelt.

Standardwerte: Die Proben der Substanz- Ca^{2+} -RNS-Lösung wurden verascht, entsprechend verdünnt und auf $2,5\text{ ml}$ mit 1 %iger Lanthanchloridlösung aufgefüllt.

Die Extinktionen der so behandelten Proben wurden am Atom-Absorptions-Spektrophotometer Typ 403 (Firma Perkin-Elmer) gemessen.

Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei allen Versuchen 2 ml bei 3×100 averages.

Bestimmt wurde ebenfalls die Gesamtkonzentration von Calcium in der Substanz- Ca^{2+} -RNS-Lösung in $0,2\text{ M}$ Trispuffer pH $7,40$. Es wurden jeweils Proben von $1,0\text{ ml}$ pipettiert und nach der unter 7 (Bestimmung der Calciumkonzentration) aufgeführten Methode weiterverarbeitet.

Die Gesamtcalciumkonzentration der RNS-Lösungen setzt sich zusammen aus dem Calciumgehalt der RNS und der zugegebenen Menge an Calciumchlorid (siehe Tab. 1 u. Abb. 1).

Tabelle 1

Calciumgesamtkonzentration der verwendeten Ca^{2+} -RNS-Lösungen.

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 29 - 31$ Versuchen dar.

Calcium-RNS-Lösung	Calciumgehalt einer 0,5%igen RNS-Lösung [$\cdot 10^{-3}$ M]	Calciumgesamtkonzentration = c der Ca^{2+} -RNS-Lösungen [$\cdot 10^{-3}$ M]
$10^{-3}\text{M Ca}^{2+} + 0,5\% \text{ RNS-Lsg.}$	0,49	$1,49 \pm 0,03$ ($N = 29$)
$5 \cdot 10^{-4}\text{M Ca}^{2+} + 0,5\% \text{ RNS-Lsg.}$	0,49	$0,99 \pm 0,02$ ($N = 31$)
$10^{-4}\text{M Ca}^{2+} + 0,5\% \text{ RNS-Lsg.}$	0,46	$0,56 \pm 0,02$ ($N = 31$)
$5 \cdot 10^{-5}\text{M Ca}^{2+} + 0,5\% \text{ RNS-Lsg.}$	0,46	$0,51 \pm 0,02$ ($N = 31$)

Abb. 1

Die Säulen zeigen die bestimmte Gesamtcalciumkonzentration [$10^{-3}M$] auf der Ordinate.

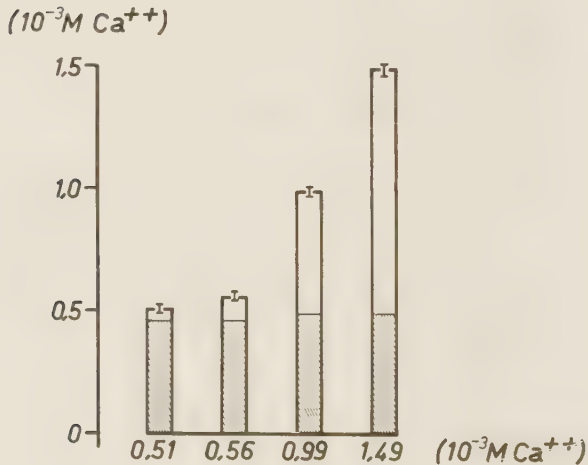
schraffierter Teil der Säulen:

die in einer 0,5 %igen Hefe-RNS-Lösung vorhandene molare Ca^{2+} -Konzentration

weißer Teil der Säulen:

zugesetzte molare Calciumchloridkonzentration

Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 29 - 31$ Versuchen dar.



8. Einfluß von Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 und BG 60 auf die Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure

Es wurden in mehreren Versuchsreihen der Ca^{2+} -RNS-Lösung Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 oder BG 60 in steigenden Konzentrationen zugesetzt und die Abhängigkeit der Bindung von Calciumionen an RNS von der zugegebenen Substanzkonzentration bestimmt.

9. Charakterisierung der Wechselwirkung von Calciumionen mit Ribonukleinsäure

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung der Calciumionen mit RNS wurde der prozentuale Anteil α an freier Calciumionenkonzentration und die apparente Bindungskonstante k^+ ermittelt.

Darüberhinaus wurde die Wechselwirkung von Calciumionen mit RNS durch die Konstanten m , K , K_1 und die Anzahl n der Bindungsstellen charakterisiert. Dazu wurde für die Hefe-RNS ein Molekulargewicht von 100 000 bzw. 500 000 angenommen (Riechert u. Wollert, 1971 a).

10. Statistische Methoden

Für jede Versuchsreihe wurden die Mittelwerte $\bar{x}$ der Proben, die Standardabweichung s und der Standardfehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ nach folgenden Formeln berechnet:

$$(1) \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (n=\text{Anzahl der Versuche})$$

$$(2) \quad s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2}{n - 1}}$$

$$(3) \quad s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Zur Prüfung, ob sich die Mittelwerte des freien Ca^{2+} -Anteils (α -Werte) zwischen den Gruppen (Versuchsbedingungen) insgesamt gesehen mehr als rein zufällig unterscheiden, wurde eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. Zur Entscheidung, welche Versuchsbedingungen einen, gegenüber der Kontrolle, erhöhten freien Anteil α an Calciumionen aufweisen, wird der Test nach Dunnett (Miller, 1966) im Anschluß an die Varianzanalyse durchgeführt.

Zur Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung werden nach Logarithmierung der Dosen und Wirkungen lineare Regressionen gerechnet. Gleichzeitig wird geprüft, ob sich die Steigung der einzelnen Wirkungsgeraden mehr als rein zufällig unterscheiden.

Bei der Berechnung der apparenten Bindungskonstanten k^+ , der Gesamtbindungskonstanten K_1 und einer, der Gesamtbindungskonstanten proportionale Größe K wurden die Mittelwerte des freien Anteils der Calciumionen (α -Werte) verwendet. Diese Werte werden nur tabellarisch aufgeführt.

Um die in den Abbildungen 2 bis 9 dargestellten Mittelwerte des freien Anteils α der Calciumionen für die Wechselbeziehung von Calciumchlorid mit RNS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 und BG 60 als statistisch gesichert ansehen zu können, wurden eine einfache Varianzanalyse und ein Test nach Dunnett durchgeführt (Tab. 6).

Die einfache Varianzanalyse erlaubt zunächst nur die Simultanprüfung der Unterschiede zwischen allen Gruppenmittelwerten. Um festzustellen, welche Mittelwerte des freien Anteils α der Calciumionen sich unterscheiden, wurde der Test nach Dunnett im Anschluß an die Varianzanalyse durchgeführt.

Die einfache Varianzanalyse wurde für die eigenen Versuchsgruppen und die von Rose (1973) gemeinsam berechnet, da die Versuche gemeinsam durchgeführt wurden und eine gemeinsame Kontrollgruppe (Ca^{2+}) als Bezugsgröße benützt wurde.

Die Beurteilung der Ergebnisse bei dem Test nach Dunnett wurde wie folgt angegeben:

1. Übersteigt oder erreicht der berechnete Prüfwert den

für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % tabellierten Grenzwert $G_{5\%}$ nicht, so ist der betrachtete Mittelwertsunterschied zwischen dem Mittelwert und der Kontrolle als vermutlich zufallsbedingt und sachlich nicht vorhanden anzusehen.

($p > 5\%$ = kein Unterschied vorhanden)

2. Erreicht oder übersteigt der Prüfwert die Grenze von $G_{5\%}$, aber nicht die Grenze von $G_{1\%}$, so soll er als "auffällig" = * angesehen werden.

($1\% < p \leq 5\%$ = statistisch auffällig *)

3. Wird die Grenze von $G_{1\%}$ erreicht oder überschritten, so nennt man den Unterschied "statistisch signifikant" oder "statistisch gesichert" = ** .

($p \leq 1\%$ = statistisch signifikant **)

III. VERSUCHSERGEBNISSE

1. Der prozentuale Anteil α an freier Substanz bei Gleichgewichtsdialyse

a) Calciumionen und RNS

Die Abhängigkeit des α - Wertes von der Gesamtcalciumionenkonzentration wurde mit der Dialysemethode ermittelt (Tab. 2).

Im untersuchten Bereich nimmt der Anteil der freien Calciumionen bei steigender Gesamtcalciumionenkonzentration zu. Dabei liegen etwa 10 % der Gesamtcalciumionenkonzentration als freie Substanz vor, während ungefähr 90 % der Calciumionen an RNS gebunden sind.

Tabelle 2

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen von der Gesamtcalciumionenkonzentration = c .
0,5 %ige RNS-Lösung (pH 7,40), Zimmertemperatur (22°C).
16 Std. Dialyse.

Die α - Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils N = 21 - 23 Versuchen dar.

$\text{Ca}^{2+} [\cdot 10^{-3}\text{M}] = c$

$\alpha [\%]$

$\text{Ca}^{2+} [\cdot 10^{-3}\text{M}] = c$		$\alpha [\%]$
0,51	N = 23	$10,02 \pm 0,15$
0,56	N = 23	$10,47 \pm 0,24$
0,99	N = 23	$11,84 \pm 0,32$
1,49	N = 21	$14,27 \pm 0,72$

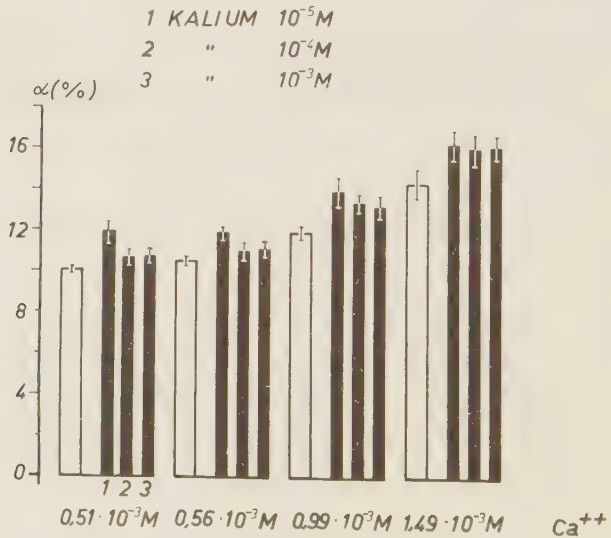
b) Einfluß von KCl auf die Calciumionen-Bindung an RNS (Abb. 2)

Unter Zusatz steigender Konzentrationen von KCl ($10^{-5}M$ bis $10^{-3}M$) nimmt die Bindung von Calciumionen an RNS gegenüber KCl-freien Lösungen ab.

Der α - Wert nimmt für Calciumionen ($c=0,51 \cdot 10^{-3}M$) von 10,02% auf 11,84% durch $10^{-5}M$ KCl-Zusatz zu; der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Tab.6).

Abb. 2

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α % , Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender KCl-Konzentrationen (schwarze Säulen). Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21-23$ (Ca^{2+}) und $N = 7$ (KCl) Versuchen dar.



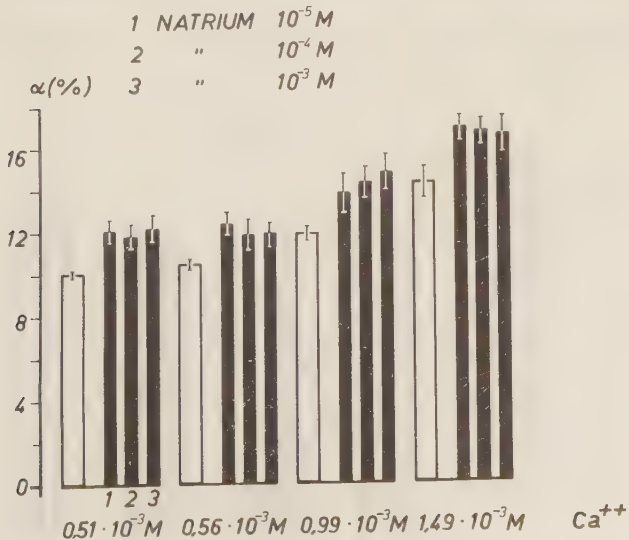
c) Einfluß von NaCl auf die Calciumionen-Bindung an RNS
(Abb. 3)

Unter Zusatz steigender Konzentrationen von NaCl ($10^{-5}M$ bis $10^{-3}M$) nimmt die Bindung von Calciumionen an RNS gegenüber NaCl-freien Lösungen nicht einheitlich ab.

Der α - Wert nimmt für Calciumionen ($c=0,51 \cdot 10^{-3}M$) von 10,02% auf 12,02% durch $10^{-5}M$ NaCl-Zusatz zu; der Unterschied ist statistisch signifikant (Tab. 6).

Abb. 3

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen ($\alpha\%$, Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender NaCl-Konzentrationen (schwarze Säulen). Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21-23$ (Ca^{2+}) und $N = 8-11$ (NaCl) Versuchen dar.



d) Einfluß von BG 31 auf die Calciumionen-Bindung an RNS
(Abb. 4)

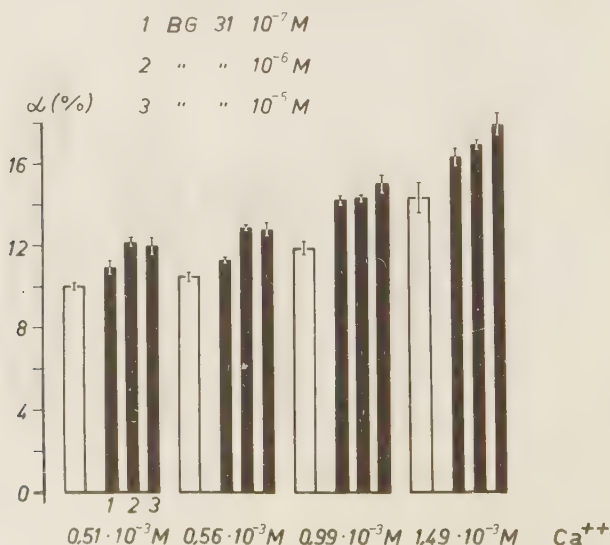
Unter Zusatz steigender Konzentrationen von BG 31 ($10^{-7}M$ bis $10^{-5}M$) nimmt die Bindung von Calciumionen an RNS gegenüber BG 31-freien Lösungen ab.

Der α - Wert nimmt für Calciumionen ($c=0,51 \cdot 10^{-3}M$) von 10,02% auf 12,16% durch $10^{-6}M$ BG 31-Zusatz zu.

Der Unterschied der α - Werte ist unter dem Zusatz von $10^{-6}M$ BG 31 statistisch auffällig und bei Zusatz von $10^{-5}M$ BG 31 statistisch signifikant (Tab. 6).

Abb. 4

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α % , Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender BG 31-Konzentrationen (schwarze Säulen). Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21-23$ (Ca^{2+}) und $N = 8$ (BG 31) Versuchen dar.

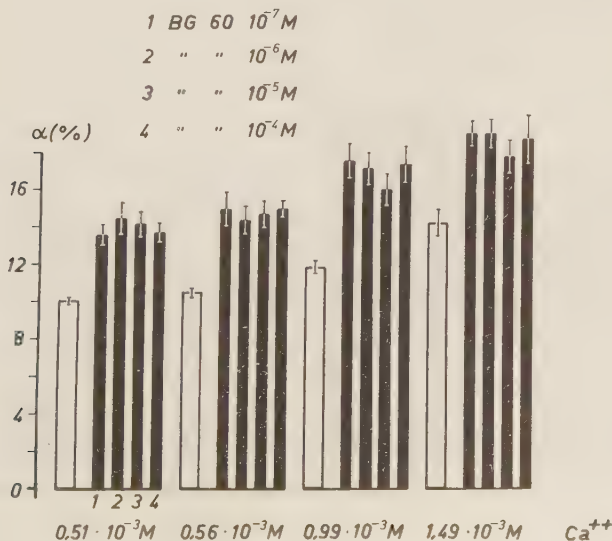


e) Einfluß von BG 60 auf die Calciumionen-Bindung an RNS (Abb. 5)

Der α - Wert für Calciumionen steigt bei Zugabe von steigenden BG 60-Konzentrationen ($10^{-7}M$ bis $10^{-4}M$) jeweils statistisch signifikant an. Bei einer Gesamtcalciumionenkonzentration von $c=0,51 \cdot 10^{-3}M$ und einer BG 60-Konzentration von $10^{-7}M$ findet sich ein α - Wert von 13,54%, der sich signifikant vom α - Wert von 10,02% bei Ca^{2+} -RNS-Dialyse unterscheidet (Tab. 6).

Abb. 5

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α % , Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration (weiße Säulen) und unter dem Einfluß steigender BG 60-Konzentrationen (schwarze Säulen). Die Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21-23$ (Ca^{2+}) und $N = 7$ (BG 60) Versuchen dar.



Eine graphische Zusammenstellung der α - Werte (Abb. 6 - 9) zeigt die Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α % , Ordinate) von einer bestimmten Gesamtcalciumionenkonzentration und unter dem Einfluß steigender Substanzkonzentrationen.

Bei einer Gesamtcalciumionenkonzentration von $c=0,51 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (Abb. 6) zeigt der freie Anteil α der Calciumionen bei Zusatz von steigenden KCl-Konzentrationen keine, von steigenden NaCl- und BG 60-Konzentrationen und von 10^{-6}M BG 31 eine statistisch signifikante und bei 10^{-5}M BG 31 eine statistisch auffällige Erhöhung.

Bei einer Gesamtcalciumionenkonzentration von $c=0,56 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (Abb. 7) zeigt der freie Anteil α der Calciumionen bei Zusatz von steigenden KCl- und NaCl-Konzentrationen keine, von steigenden BG 60-Konzentrationen eine statistisch signifikante und bei 10^{-6}M BG 31- und 10^{-5}M BG 31-Konzentration eine statistisch auffällige Erhöhung.

Bei einer Gesamtcalciumionenkonzentration von $c=0,99 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (Abb. 8) zeigt der freie Anteil α der Calciumionen bei Zusatz von steigenden KCl-Konzentrationen keine, von steigenden BG 60-Konzentrationen eine statistisch signifikante, bei 10^{-4}M NaCl- bzw. 10^{-6}M BG 31-Konzentration eine statistisch auffällige und bei 10^{-3}M NaCl- bzw. 10^{-5}M BG 31-Konzentration eine statistisch signifikante Erhöhung.

Bei einer Gesamtcalciumionenkonzentration von $c=1,49 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (Abb. 9) zeigt der freie Anteil α der Calciumionen bei

Zusatz von steigenden KCl-Konzentrationen keine, von steigenden NaCl-Konzentrationen eine statistisch auffällige, von steigenden BG 60-Konzentrationen eine statistisch signifikante, bei 10^{-6} M BG 31 eine statistisch auffällige und bei 10^{-5} M BG 31 eine statistisch signifikante Erhöhung.

Abb. 6

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α %, Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration $c=0,51 \cdot 10^{-3}$ M allein (schwarze Säule) und unter dem Einfluß steigender Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen) im Vergleich miteinander.

Die α - Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca^{2+}) und $N = 7-11$ (Substanzen) Versuchen dar.

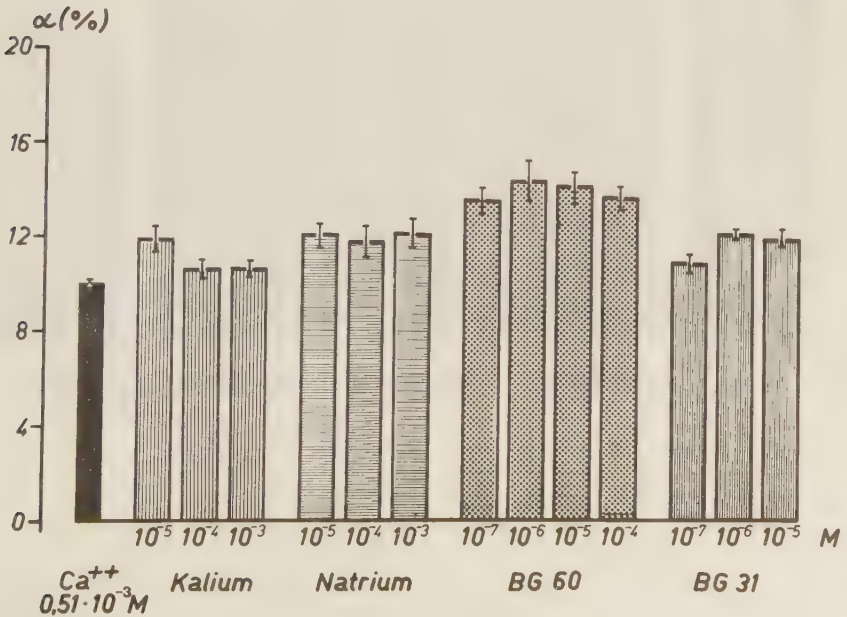


Abb. 7

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α %, Ordinate) von der Gesamtcalciumionen-konzentration $c=0,56 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ allein (schwarze Säule) und unter dem Einfluß steigender Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen) im Vergleich miteinander.

Die α - Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca^{2+}) und $N = 7-11$ (Substanzen) Versuchen dar.

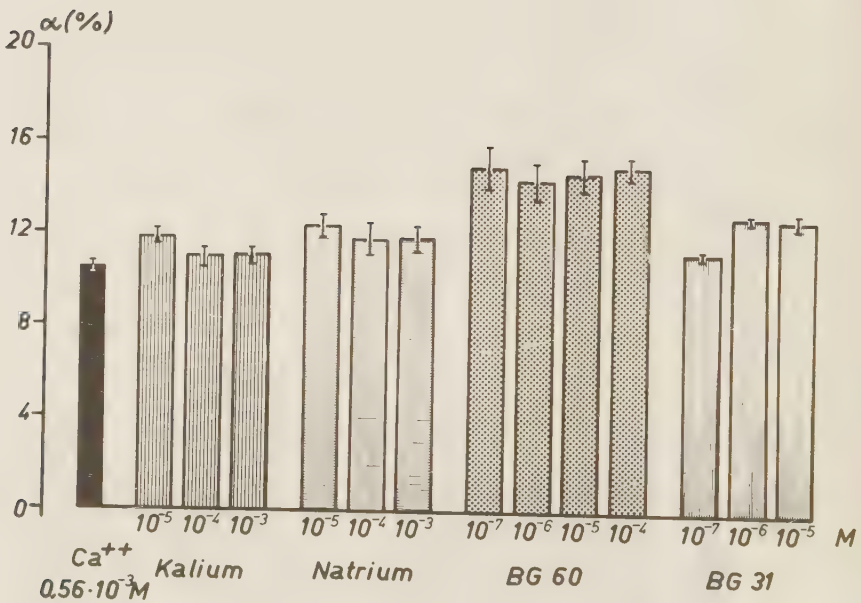


Abb. 8

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α %, Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration $c=0,99 \cdot 10^{-3} \text{M}$ allein (schwarze Säule) und unter dem Einfluß steigender Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen) im Vergleich miteinander.

Die α - Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 23$ (Ca^{2+}) und $N = 7-11$ (Substanzen) Versuchen dar.

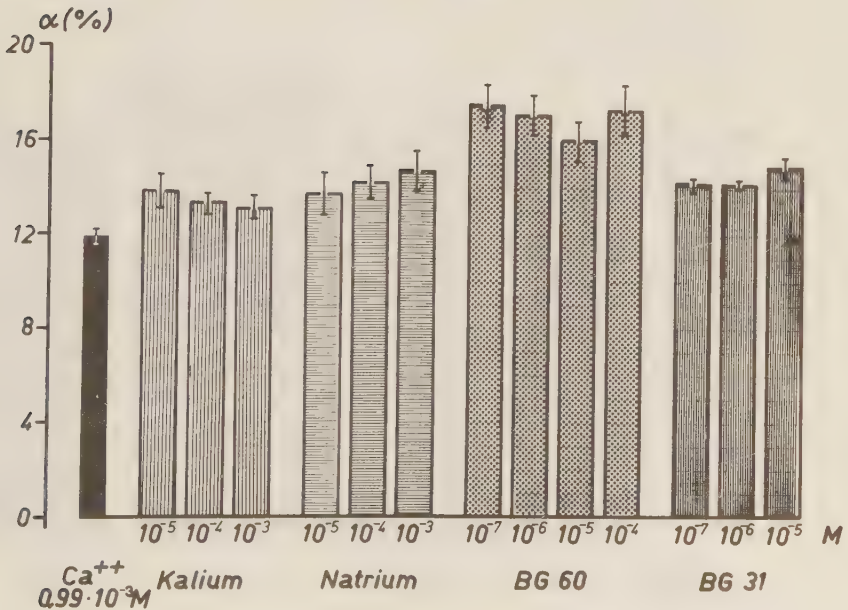
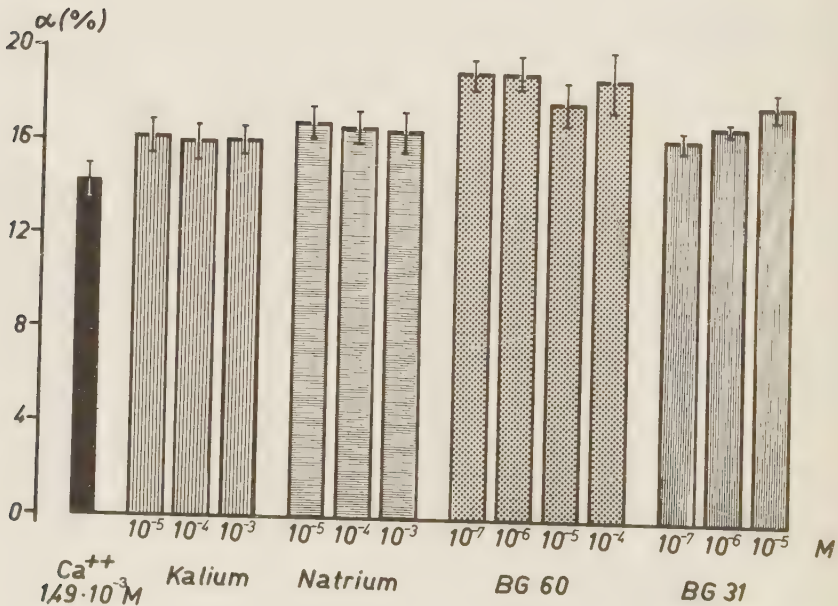


Abb. 9

Abhängigkeit des prozentualen Anteils α an freien Calciumionen (α %, Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration $c=1,49 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ allein (schwarze Säule) und unter dem Einfluß steigender Substanzkonzentrationen (gemusterte Säulen) im Vergleich miteinander.

Die α - Werte stellen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils $N = 21$ (Ca^{2+}) und $N = 7-11$ (Substanzen) Versuchen dar.



2. Weitere Charakterisierung der Bindung von Calcium- ionen an die RNS

Nach Scholtan (1962) lassen sich die Bindungsversuche im doppeltlogarithmischen System als gerade Linien wiedergeben, die in dem untersuchten Konzentrationsbereich durch die Gleichung:

$$\log c_g = \log k^+ + m \cdot \log c_f$$

$$k^+ = c_g / c_f^m \quad (k^+, m = \text{Konstanten})$$

definiert werden können. Die Konzentration c_g (als Ordinate) wird gegen die Konzentration c_f (als Abszisse) im doppeltlogarithmischen Netz aufgetragen (Abb. 10). Es ergibt sich eine Gerade, die sogenannte mittlere Bindungsgerade. Die Konstante k^+ kennzeichnet die Bindungsfähigkeit, die umso größer ist, je größer die Konstante k^+ ist.

Für Calciumionen errechnete sich eine apparente Bindungskonstante k^+ , die das Bindungsvermögen in dem untersuchten Konzentrationsbereich beschreibt von $7,58 [(10^{-4}M)^{1-m}]$.

Die apparente Bindungskonstante k^+ wurde auch unter dem Einfluß der untersuchten Substanzen ermittelt. Die so erhaltenen k^+ - Werte sind in Tabelle 3 angegeben.

Abb. 10

Wechselbeziehung einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz der untersuchten KCl-, NaCl-, BG 31- oder BG 60-Konzentrationen.

Darstellung nach Scholtan (1962).

Abhängigkeit der Konzentration c_g an gebundener Substanz (in $10^{-4}M$, Ordinate) von der Konzentration c_f an freier Substanz (in $10^{-4}M$, Abszisse). Die für das doppelt-logarithmische System berechneten Gleichungen der Regressionsgeraden lauten:

X Ca^{2+} -RNS-Lösung

$$(\log c_g = 0,87981 + 0,74414 \cdot \log c_f ; N= 90 ; r=0,99999)$$

O Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von KCl

$$(\log c_g = 0,83836 + 0,70521 \cdot \log c_f ; N= 84 ; r=0,99999)$$

□ Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von NaCl

$$(\log c_g = 0,81761 + 0,72214 \cdot \log c_f ; N=117 ; r=0,99999)$$

● Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von BG 31

$$(\log c_g = 0,81279 + 0,70708 \cdot \log c_f ; N= 96 ; r=0,99999)$$

△ Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von BG 60

$$(\log c_g = 0,75061 + 0,75154 \cdot \log c_f ; N=112 ; r=0,99999)$$

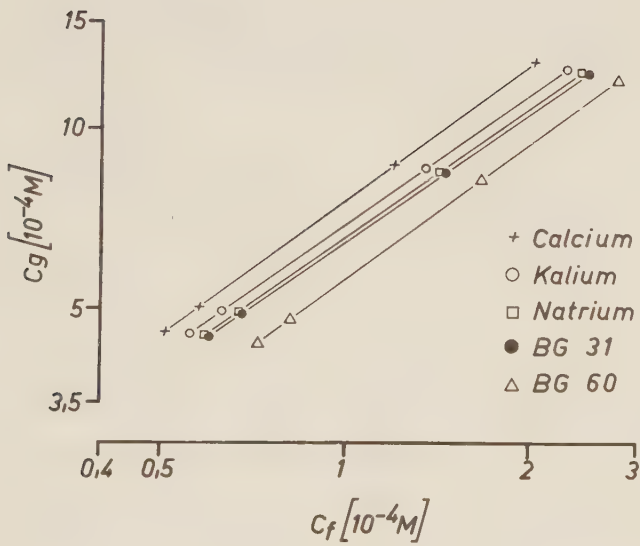
N = Anzahl der Versuche ; r = Korrelationskoeffizient

Die Punkte an den Regressionsgeraden begrenzen den untersuchten Konzentrationsbereich.

Einzelwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

Abb. 10

Legende und Regressionsgleichungen siehe Seite 26



Weiterhin wurden nach Scholtan (1962) die Dosis-Wirkungsbeziehungen einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz von den untersuchten Kaliumchlorid-, Natriumchlorid-, BG 31- oder BG 60 - Konzentrationen im doppeltlogarithmischen System (Abb. 11) wiedergegeben.

Die Abhängigkeit der Wirkung, die sich in einer Erhöhung des Anteils a an freien Calciumionen ausdrückt (als Ordinate) von der Dosis, der Gesamtcalciumionenkonzentration c (als Abszisse), stellt sich so als Gerade, als die sogenannte mittlere Bindungsgerade dar.

Die Steigungskonstante b der mittleren Bindungsgeraden der Dosis-Wirkungsbeziehung für die untersuchten Substanzen ist in allen Fällen kleiner als 1 (Abb. 11 und Tab. 4).

Eine signifikante Abweichung von der Parallelität für die lineare Funktion ($\log y = \log a + b \cdot \log x$) der Dosis-Wirkungsbeziehung zeigt sich nur bei der Behandlung von Kaliumchlorid mit 0,5 %iger Ca^{2+} -RNS-Lösung im Vergleich von BG 60 mit 0,5 %iger Ca^{2+} -RNS-Lösung und auch bei der Behandlung von BG 31 mit 0,5 %iger Ca^{2+} -RNS-Lösung im Vergleich von BG 60 mit 0,5 %iger Ca^{2+} -RNS-Lösung (Abb. 11).

Abbildung 11

Dosis-Wirkungsbeziehung einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz von den untersuchten KCl-, NaCl-, BG 31- oder BG 60-Konzentrationen.

Abhängigkeit des Anteils d an freier Substanz (in %, Ordinate) von der Gesamtcalciumionenkonzentration c (in $10^{-3}M$, Abszisse).

Die für das doppeltlogarithmische System berechneten Gleichungen der linearen Regressionen ($\log y = \log a + b \cdot \log x$) lauten:

X Ca^{2+} -RNS-Lösung

$$(\log y = 0,59770 + 0,292 \log x ; N = 90 ; r = 0,67)$$

O Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von KCl

$$(\log y = 0,62014 + 0,344 \log x ; N = 84 ; r = 0,82)$$

□ Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von NaCl

$$(\log y = 0,61278 + 0,315 \log x ; N = 117 ; r = 0,67)$$

● Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von BG 31

$$(\log y = 0,62118 + 0,337 \log x ; N = 96 ; r = 0,88)$$

△ Ca^{2+} -RNS-Lösung mit Zusatz von BG 60

$$(\log y = 0,60314 + 0,263 \log x ; N = 112 ; r = 0,66)$$

N = Anzahl der Versuche ; r = Korrelationskoeffizient

Abb. 11

Legende und Regressionsgleichungen siehe Seite 29

Die Punkte an den Regressionsgeraden begrenzen den untersuchten Konzentrationsbereich.

Einzelwerte wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen.

$\log y \cong$ dem Anteil α an freier Substanz (in %, Ordinate)

$\log x \cong$ der Gesamtcalciumionenkonzentration c (in $10^{-3}M$, Abszisse)

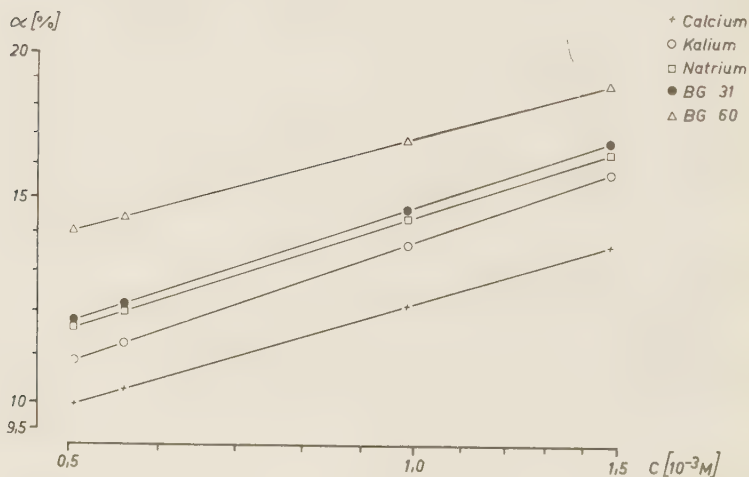


Tabelle 3

Apparente Bindungskonstante k^+ und Steigungskonstante m für die Wechselwirkung von Calciumionen mit 0,5 %iger Hefe-RNS-Lösung allein und unter dem Einfluß der untersuchten KCl-, NaCl-, BG 31- oder BG 60-Konzentrationen.

Berechnung nach Scholtan (1962).

	$k^+ \cdot [(10^{-4}M)^{1-m}]$	m
Ca ²⁺ -RNS-Lsg.	7,58	0,74414
Ca ²⁺ -RNS-Lsg. + KCl	6,89	0,70521
Ca ²⁺ -RNS-Lsg. + NaCl	6,57	0,72214
Ca ²⁺ -RNS-Lsg. + BG 31	6,50	0,70708
Ca ²⁺ -RNS-Lsg. + BG 60	5,63	0,75154

Tabelle 4

Statistische Maßzahlen für die Dosis-Wirkungsbeziehung einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calciumchlorid allein und unter dem Zusatz der untersuchten KCl-, NaCl-, BG 31- oder BG 60-Konzentrationen.

Lineare Regression : $\log y = \log a + b \cdot \log x$

Angegeben sind die Steigung b , der Streckenabschnitt a , der Korrelationskoeffizient r , die Vertrauensgrenze von 95 % für den Korrelationskoeffizient r , das Bestimmtheitsmaß B und die Anzahl N der Versuche für die linearen Regressionsgeraden.

	b	a	r	95%Grenze	B	N
Ca^{2+} -RNS-Lsg.	0,292	3,96	0,67	0,53-0,77	0,44	90
Ca^{2+} -RNS-Lsg. + KCl	0,344	4,17	0,82	0,73-0,88	0,67	84
Ca^{2+} -RNS-Lsg. + NaCl	0,315	4,10	0,67	0,56-0,76	0,45	117
Ca^{2+} -RNS-Lsg. + BG 31	0,337	4,18	0,88	0,83-0,92	0,77	96
Ca^{2+} -RNS-Lsg. + BG 60	0,263	4,01	0,66	0,54-0,75	0,44	112

Eine der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K erhält man nach Scholtan (1964) aus Abb. 11, wenn man den Quotienten c_g / c_f gegen die Konzentration c_g an gebundener Substanz aufträgt und die Gerade auf $c_g = 0$ extrapoliert. Um aus der Größe K die Gesamtbindungskonstante K_1 berechnen zu können, muß man diese Konstante K durch die molare Konzentration der bindenden RNS dividieren.

Wegen der starken Krümmung der Kurven ist der Wert K nur näherungsweise bestimmbar.

K_1 erhält man außerdem graphisch nach Scatchard (1949) als Schnittpunkt der Kurve mit der Ordinate (Abb. 12). Da das Molekulargewicht der verwendeten Hefe-RNS nicht bekannt ist, kann die Gesamtbindungskonstante K_1 nur für die angenommenen Molekulargewichte (100 000 bzw. 500 000) angegeben werden.

In Tabelle 5 sind K und K_1 für die Wechselwirkung von Calciumionen mit RNS allein und unter dem Einfluß von steigenden Konzentrationen von Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 und BG 60 für ein angenommenes Molekulargewicht der Hefe-RNS von 100 000 und 500 000 angegeben.

Ergeben sich bei der Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. 12), wobei der Quotient $\bar{r}/c_f$ gegen das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ aufgetragen wird, keine Geraden, sondern gekrümmte Linien, so ist das ein Hinweis dafür, daß die bindenden Gruppen der RNS-Moleküle unterschied-

lich sind (Scholtan, 1964).

Um das Bindungsvermögen auch in diesem Falle durch eine einfache Kennzahl charakterisieren zu können, eignet sich die Gesamtbindungskonstante K_1 . K_1 erhält man auch bei gekrümmten Bindungslinien, wenn man den Quotienten $\bar{r}/c_f$ gegen das spezifische Bindungsvermögen $\bar{r}$ aufträgt und auf $\bar{r} = 0$ bzw. $c_f = 0$ extrapoliert. Wegen der starken Krümmung der Bindungslinien lassen sich die Bindungskonstanten K_1 der einzelnen Substanzen nur näherungsweise bestimmen.

Die Anzahl n der Bindungsstellen pro RNS-Molekül kann graphisch nach Scatchard (1949) als Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse ermittelt werden (Abb. 13). Da die erhaltenen Kurven im hohen Konzentrationsbereich der Abszisse nahezu parallel verlaufen, muß die Anzahl n der Bindungsstellen der 0,5 %igen Hefe-RNS-Lösung für Calciumchlorid und bei Anwesenheit der untersuchten Substanzen wesentlich größer als 24 bzw. 120 sein (angenommenes Hefe-RNS-Molekulargewicht von 100 000 bzw. 500 000).

Abb. 12

Bindungsvermögen einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calcium-
ionenzusatz allein und in Anwesenheit der untersuchten
Substanzkonzentrationen von KCl , NaCl , BG 31 und BG 60 .

Abhängigkeit des Quotienten c_g/c_f (Ordinate) von der
Konzentration c_g (in $10^{-4}M$, Abszisse) an gebundenen
Calciumionen.

Die Punkte in der Abbildung stellen arithmetische
Mittelwerte dar ($N = 84$ bis 117).

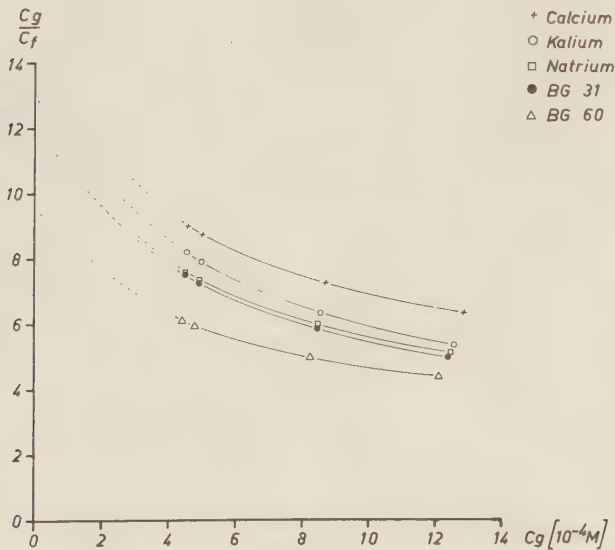


Abb. 13

Bindungsvermögen einer 0,5 %igen RNS-Lösung mit Calcium-
ionenzusatz allein und in Anwesenheit der untersuchten
Substanzkonzentrationen von KCl , NaCl , BG 31 und BG 60 .

Abhängigkeit des Quotienten $\bar{r}/c_f$ (10^4 l/M) auf der
Ordinate von dem spezifischen Bindungsvermögen $\bar{r}$ (M/M)
auf der Abszisse (Darstellung nach Scatchard, 1949).

Angenommenes RNS-Molekulargewicht von 500 000.

Die Punkte in der Abbildung stellen arithmetische
Mittelwerte dar (N = 84 bis 117).

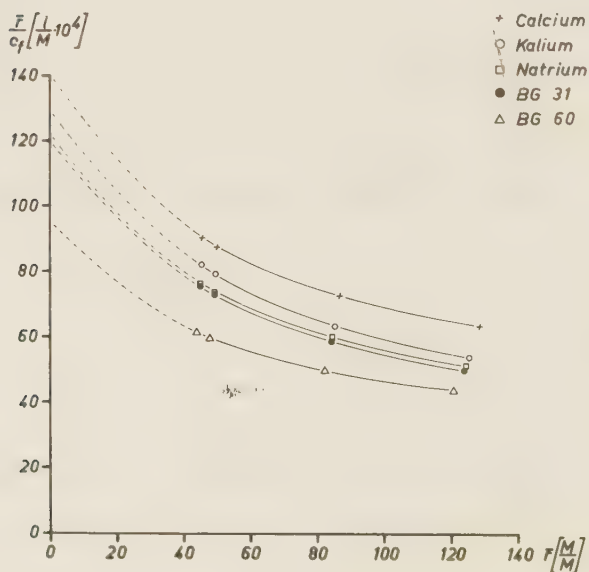


Tabelle 5

Gesamtbindungskonstante K_1 und die der Gesamtbindungskonstanten K_1 proportionale Größe K für die Wechselwirkung von Calciumionen mit 0,5 %iger Hefe-RNS-Lösung allein und unter dem Einfluß von den zugesetzten Substanzkonzentrationen.

Angenommenes RNS-Molekulargewicht 100 000 bzw. 500 000 .

Lösungen	K (Abb.12)	$K_1 [10^4 \text{ l/M}]$ aus K berechnet und nach Scatchard (Abb. 13) RNS-MG 100 000	$K_1 [10^4 \text{ l/M}]$ aus K berechnet und nach Scatchard (Abb. 13) RNS-MG 500 000
Ca^{2+} -RNS-Lsg.	~ 14	~ 28	~ 140
+ KCl	~ 12,9	~ 25,8	~ 129
+ NaCl	~ 12,2	~ 24,4	~ 122
+ BG 31	~ 12	~ 24	~ 120
+ BG 60	~ 9,5	~ 19	~ 95

Tabelle 6

Test nach Dunnett im Anschluß an die Varianzanalyse.

Kontrollgruppe ist die Gesamtcalciumionenkonzentration c .

Prüfwerte sind die steigenden Konzentrationen von

Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 und BG 60.

c = Gesamtcalciumionenkonzentration, Z = zugesetzte Substanzkonzentration, N = Anzahl der Versuche, $\bar{x}$ = Mittelwert der α - Werte in Prozent, $\Delta Z - Ca^{2+}$ = Mittelwertsdifferenzen

* $1\% < p \leq 5\%$ auffällige Differenzen

** $p \leq 1\%$ signifikante Differenzen

c in [$10^{-3}M$]	N	$\bar{x}_{Ca}$	Z	N	$\bar{x}_Z$	$\Delta Z - \bar{x}_{Ca}$
0,51	23	10,02	KCl $10^{-5}M$	7	11,84	1,82
			$10^{-4}M$	7	10,61	0,59
			$10^{-3}M$	7	10,66	0,64
			NaCl $10^{-5}M$	9	12,02	2,00 **
			$10^{-4}M$	10	11,78	1,76 *
			$10^{-3}M$	11	12,15	2,13 **
			BG 31 $10^{-7}M$	8	10,90	0,88
			$10^{-6}M$	8	12,16	2,14 **
			$10^{-5}M$	8	11,94	1,92 *
			BG 60 $10^{-7}M$	7	13,54	3,52 **
			$10^{-6}M$	7	14,43	4,41 **
			$10^{-5}M$	7	14,11	4,09 **
			$10^{-4}M$	7	13,68	3,66 **

Tab. 6 (Fortsetzung)

c in [10 ⁻³ M]	N	$\bar{x}_{Ca}$	Z	N	$\bar{x}_Z$	$\Delta_{Z-\bar{x}_{Ca}}$	
0,56	23	10,47	KCl	10 ⁻⁵ M	7	11,86	1,39
				10 ⁻⁴ M	7	10,96	0,49
				10 ⁻³ M	7	11,01	0,54
			NaCl	10 ⁻⁵ M	8	12,36	1,89
				10 ⁻⁴ M	10	11,81	1,34
				10 ⁻³ M	10	11,82	1,35
			BG 31	10 ⁻⁷ M	8	11,23	0,76
				10 ⁻⁶ M	8	12,80	2,33 *
				10 ⁻⁵ M	8	12,72	2,25 *
			BG 60	10 ⁻⁷ M	7	14,93	4,46 **
				10 ⁻⁶ M	7	14,35	3,88 **
				10 ⁻⁵ M	7	14,66	4,19 **
				10 ⁻⁴ M	7	14,92	4,45 **
0,99	23	11,84	KCl	10 ⁻⁵ M	7	13,84	2,00
				10 ⁻⁴ M	7	13,31	1,47
				10 ⁻³ M	7	13,12	1,28
			NaCl	10 ⁻⁵ M	9	13,76	1,92
				10 ⁻⁴ M	10	14,27	2,43 *
				10 ⁻³ M	10	14,72	2,88 **

Tab. 6 (Fortsetzung)

c in [10 ⁻³ M]	N	$\bar{x}_{Ca}$	Z	N	$\bar{x}_Z$	$\Delta_{Z-\bar{x}_{Ca}}$
			BG 31 10 ⁻⁷ M	8	14,13	2,29
			10 ⁻⁶ M	8	14,22	2,38 *
			10 ⁻⁵ M	8	14,91	3,07 **
			BG 60 10 ⁻⁷ M	7	17,54	5,70 **
			10 ⁻⁶ M	7	17,17	5,33 **
			10 ⁻⁵ M	7	16,03	4,19 **
			10 ⁻⁴ M	7	17,37	5,53 **
1,49	21	14,27	KCl 10 ⁻⁵ M	7	16,17	1,90
			10 ⁻⁴ M	7	15,94	1,67
			10 ⁻³ M	7	16,05	1,78
			NaCl 10 ⁻⁵ M	10	16,86	2,59 *
			10 ⁻⁴ M	10	16,65	2,38 *
			10 ⁻³ M	10	16,52	2,25 *
			BG 31 10 ⁻⁷ M	8	16,23	1,96
			10 ⁻⁶ M	8	16,83	2,56 *
			10 ⁻⁵ M	8	17,80	3,53 **
			BG 60 10 ⁻⁷ M	7	19,09	4,82 **
			10 ⁻⁶ M	7	19,06	4,79 **
			10 ⁻⁵ M	7	17,80	3,53 **
			10 ⁻⁴ M	7	18,78	4,51 **

Tabelle 6 (Schluß) - Tabelle der Varianzanalyse

Art der Streuung	Zahl der Freiheitsgrade	Summe der Abweichungsquadrate SAQ	Mittleres Abweichungsquadrat MAQ	F-Wert	Signifikanz
$c=0,51 \cdot 10^{-3} M Ca^{2+}$					
Zwischen den Substanzen	29	6 063 970,1	209 102,4	10,71	**
Innerhalb der Substanzen	199	3 883 994,1	19 517,5		
Insgesamt	228	9 947 964,2			
$c=0,56 \cdot 10^{-3} M Ca^{2+}$					
Zwischen den Substanzen	29	7 331 033,3	252 794,2	9,29	**
Innerhalb der Substanzen	198	5 388 822,8	27 216,3		
Insgesamt	227	12 719 856,1			
$c=0,99 \cdot 10^{-3} M Ca^{2+}$					
Zwischen den Substanzen	29	8 127 690,3	280 265,2	8,49	**
Innerhalb der Substanzen	198	6 538 390,1	33 022,2		
Insgesamt	227	14 666 080,4			
$c=1,49 \cdot 10^{-3} M Ca^{2+}$					
Zwischen den Substanzen	29	7 471 091,9	257 623,8	6,39	**
Innerhalb der Substanzen	197	7 940 146,0	40 305,3		
Insgesamt	226	15 411 237,9			

IV. DISKUSSION

Die verwendete RNS aus Hefe stellt ein inhomogenes Gemisch aus hochmolekularen Anteilen (überwiegend ribosomale RNS) und niedermolekularen Bestandteilen, die bei der Extraktion und durch Kontamination mit Ribonuclease entstanden sind, dar. Die niedermolekularen Anteile (z.B. Oligonucleotide) würden die Bindungsversuche bei Anwendung der Gleichgewichtsdialyse störend beeinflussen. Die RNS-Bruchstücke könnten die Dialysemembran passieren und infolgedessen durch Bindung der jeweils zu untersuchenden niedermolekularen Substanz deren α - Wert erhöhen. Es ist daher eine unerläßliche Voraussetzung für derartige Bindungsversuche, die Hefe-RNS zur Reinigung ausreichend vorzudialysieren. Riechert und Wollert (1971 a) fanden nach einer Vordialyse von 4 Tagen einen konstanten Wert von 2-2,5 % niedermolekularer RNS-Bruchstücke von der RNS-Gesamtkonzentration im Puffer. Dieser Rest an RNS-Bruchstücken könnte noch den α - Wert verfälschen, so daß die in Tabelle 2 angegebenen α - Werte bei Dialyse etwas zu hoch sein dürften.

Die von Krieglstein und Kuschinsky (1968) beschriebene Methode der Gleichgewichtsdialyse erwies sich als brauchbar für die Bestimmung der Wechselbeziehung zwischen niedermolekularen Substanzen und RNS (Riechert u. Wollert, 1971 a, b; Rose, 1973).

Die Bindung der Calciumionen an RNS nahm mit steigender

Konzentration leicht zu. Für die Wechselbeziehung von Calciumchlorid mit Hefe-RNS errechnete sich eine apparente Bindungskonstante k^+ , die das Bindungsvermögen in dem untersuchten Konzentrationsbereich beschreibt, von 7,58 (siehe Tab. 3). Da das Molekulargewicht der verwendeten Hefe-RNS nicht bekannt ist, konnten die Gesamtbindungskonstante K_1 und die Anzahl n der Bindungsstellen nur nach willkürlicher Festlegung eines Molekulargewichtes von 100 000 bzw. 500 000 angegeben werden. Die Anzahl n der Bindungsstellen pro RNS-Molekül wurde graphisch nach Scatchard (1949) als Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse ermittelt. Da die erhaltenen Kurven im hohen Konzentrationsbereich der Abszisse jedoch nahezu parallel verlaufen, muß die Anzahl n der Bindungsstellen der RNS für Calciumchlorid wesentlich größer als 24 bzw. 120 (angenommenes Hefe-RNS-Molekulargewicht von 100 000 bzw. 500 000) sein.

In dem untersuchten Bereich von $0,51$ bis $1,49 \cdot 10^{-3} M$ Gesamtcalciumionenkonzentration wird die Wechselbeziehung der Calciumionen mit RNS durch die untersuchten Substanzen mehr oder weniger stark beeinflusst. In Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Pharmaka werden die α - Werte der Calciumionen erhöht (Abb. 2 - 9). Der α - Wert zeigt nach allen untersuchten Substanzen bei zunehmender Calciumionenkonzentration eine steigende Tendenz. Dabei liegen etwa 10 % der Gesamtkonzentration von Calciumionen in freier Form vor, während ungefähr

90 % an RNS gebunden sind.

Zubay und Doty (1958) und Zubay (1959) vermuteten als Bindungsstellen für divalente Metallionen die Stickstoffgruppen der Nukleinsäuren. Im Gegensatz dazu behaupteten Wiberg und Neuman (1957), Felsenfeld und Huang (1959) und Shack und Bynum (1959), daß die Bindungsstellen die Phosphordiesterreste seien. Erst im Jahr 1962 konnten Banerjee und Perkins als Bindungsstellen für divalente Metallionen die sekundären Phosphorylgruppen sowohl der DNS als auch der RNS verifizieren. Die mono- und divalenten Kationen werden von den primären Phosphatgruppen der RNS gebunden (Choi und Carr, 1967), wobei divalente Kationen eine stärkere Affinität zu den Phosphatgruppen aufweisen.

Betrachtet man die Wechselwirkungen von Calciumchlorid mit RNS in Anwesenheit von Natriumchlorid, so stellt man eine Erhöhung des freien Anteils von Calciumionen fest, die jedoch nicht einheitlich statistisch signifikant ist. Für die Wechselwirkung von Calciumchlorid mit RNS in Anwesenheit von Kaliumchlorid konnte keine statistisch signifikante Erhöhung des freien Anteils von Calciumionen festgestellt werden.

Shack et al. (1953) und Butler et al. (1954) zeigten, daß divalente Kationen eine wesentlich stärkere Affinität zu den Bindungsstellen haben als monovalente Kationen. Es kann also angenommen werden, daß für eine Verdrän-

gung von Calciumionen aus deren Bindung an RNS höhere als die hier verwendeten KCl- bzw. NaCl-Konzentrationen angewendet werden müssen.

Felsenfeld und Rich (1957) und Zubay (1958; 1959) konnten in ihren Arbeiten zeigen, daß divalente Kationen einen starken Stabilisierungseffekt auf den drei-strängigen Polynukleotidkomplex besitzen. Auch die Zugabe monovalenter Kationen bewirkt eine Stabilisierung der RNS-Sekundärstruktur (Watanabe u. Kawade, 1958; Cox u. Littauer, 1962).

Eine Beeinflussung der Wechselbeziehung von Pharmaka mit Ribonukleinsäure durch Ionen konnten Last (1969), Weinbach (1971), Riechert u. Wollert (1971 a, b) und Rose (1973) in ihren Arbeiten zeigen.

Die Wechselbeziehung zwischen Calciumionen und RNS wird durch den Zusatz steigender Konzentrationen von Bisguanylhydrazonen beeinflusst und zwar dahingehend, daß sich der freie Anteil von Calciumionen erhöht.

BG 60 bewirkt in allen untersuchten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung des freien Anteils von Calciumionen. Der α - Wert steigt z.B. von 10,02 % auf 13,5 % bei einer $0,51 \cdot 10^{-3}$ molaren Ca^{2+} -RNS-Lösung an, wenn 10^{-7}M BG 60 zugesetzt werden. Natriumchlorid und BG 31 verdrängen ebenfalls Calciumionen aus deren Bindung an RNS, allerdings wird in dem untersuchten Konzentrationsbereich nur bei den höheren Konzentrationen der α - Wert

statistisch auffällig bzw. signifikant erhöht. Rose (1973) konnte bei der Zugabe von z.B. 10^{-7} M BG 32 zu einer $0,51 \cdot 10^{-3}$ molaren Ca^{2+} -RNS-Lösung ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung des α - Wertes von 10,02 % auf 13,1 % zeigen. Auch in allen anderen untersuchten Konzentrationen von BG 32 (10^{-7} M bis 10^{-4} M) stellte er eine signifikante Erhöhung des freien Anteils von Calciumionen fest.

Weinbach (1971) und Riechert und Wollert (1971 a, b) ermittelten in ihren Arbeiten, daß ein Zusatz von 0,15 molarer NaCl-Lösung bzw. 0,15 molarer KCl-Lösung oder der Zusatz von MgCl_2 bzw. CaCl_2 zu einer RNS-Lösung eine Abnahme der BG 32-, BG 31- und BG 60-Bindung an RNS bewirkt. Rose (1973) und die vorliegende Arbeit zeigen, daß auch der umgekehrte Vorgang - Freisetzung von gebundenen Calciumionen bei Zusatz von aliphatischen bzw. aromatischen Bisguanylhydrazonen - möglich ist. Da die divalenten Metallionen an die Phosphatgruppen der RNS gebunden werden (Wiberg u. Neuman, 1957; Banerjee u. Perkins, 1962; Steiner u. Beers Jr., 1962; Riechert u. Wollert, 1971 a, b), spielen möglicherweise diese Phosphatgruppen auch bei der Bindung der kationischen Bisguanylhydrazone eine Rolle.

Die Steigungskonstante m (Tab. 3) ist für alle untersuchten Substanzen kleiner als 1, was dafür spricht, daß die Konstanten der mit steigender Konzentration besetzten Bindungsstellen abnehmen (Scholtan, 1962) und

die einzelnen bindenden Gruppen des RNS-Moleküls unterschiedliche Affinität besitzen (Scholtan, 1964).

Weinbach (1971) und Riechert und Wollert (1971 a) konnten zeigen, daß trotz Erhöhung der BG-Gesamtkonzentration bis zur Sättigung der RNS-Lösung keine Sättigung der Bindungsstellen am RNS-Molekül erreicht werden kann. Durch steigende Substanzkonzentration könnte es wie bei Serumalbumin zu einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der RNS kommen, wodurch weitere Bindungsstellen verfügbar werden bzw. die Affinität der vorhandenen bindenden Gruppen zunimmt (Klotz u. Ayers, 1953).

Repke et al. (1965), Weinbach (1971) und Riechert und Wollert (1971 a, b) diskutieren für einige Bisguanilylhydrazone ionogene Bindungen. Ob bei der Bindung von BG 31 und BG 60 zusätzlich hydrophobe Eigenschaften (Scholtan, 1968; Scholtan et al., 1968) oder Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, bedarf weiterer Klärung. Steiner und Beers Jr. (1957) stellten fest, daß eine signifikante Bindung von Calciumionen an Polyadenylsäure durch Chelatbildung stattfindet.

Bei Verteilungsversuchen ist sowohl für BG 31 (Hofmann u. Wollert, 1969 a; Duhm et al., 1969) als auch für BG 60 (Hofmann u. Wollert, 1969 b) eine lange Verweildauer im Meerschweinchenorganismus nachgewiesen worden. Untersuchungen über die subcelluläre Verteilung von BG 60 im Meerschweinchenherzen ergaben

die höchste auf Protein bezogene Konzentration in der Mikrosomenfraktion (Hofmann u. Wollert, 1969 c). Da die Mikrosomenfraktion vorwiegend RNS (ungefähr 50 %) und Eiweiß enthält (Siebert, 1967), könnte die lange Verweildauer von BG 60 im Herzen und die Anreicherung in der Mikrosomenfraktion durch Bindung an eine der genannten Strukturen bedingt sein. Da die Bindung der Substanzen an Ribonukleinsäure sehr stark ist, wäre es vorstellbar, daß für BG 60 auch beim Menschen eine ionogene Bindung an RNS für die lange Halbwertszeit und Anreicherung im Herzen (Hofmann u. Wollert, 1969 a, b, c; Duhm et al., 1969) von Bedeutung ist.

Somit könnte man sagen, daß die herzoglykosidartig wirkenden Bisguanylhydrazone im Austausch gegen Calciumionen an Ribonukleinsäure gebunden werden. Die freigesetzten Calciumionen könnten durchaus für die positiv inotrope Wirkung dieser Substanzen mit verantwortlich sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde untersucht, ob monovalente Kationen (K^+ , Na^+) und herzoglykosidartig wirkende Bisguanylhydrazone (Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon-dichlorid = BG 31 ; 3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenyl-bisguanylhydrazon-dichlorid = BG 60) Calciumionen aus ihrer Bindung an Hefe-Ribonukleinsäure verdrängen können.

Als charakteristische Größen der Wechselwirkung zwischen Calciumchlorid und Ribonukleinsäure mit und ohne Zusatz von Kaliumchlorid, Natriumchlorid, BG 31 und BG 60 wurden der prozentuale Anteil α an freier Substanz, die apparente Bindungskonstante k^+ und die Steigungskonstante m bestimmt. Die Größen der Gesamtbindungskonstante K_1 und der Anzahl n der Bindungsstellen wurden bei den angenommenen Molekulargewichten der Hefe-RNS von 100 000 und 500 000 angegeben.

Die Bindung der Calciumionen an RNS nahm mit steigender $CaCl_2$ -Konzentration zu. In Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Pharmaka wird der α - Wert der Calciumionen erhöht.

BG 60 bewirkt in allen untersuchten Konzentrationen ($10^{-7}M$ bis $10^{-4}M$) eine signifikante, Natriumchlorid und BG 31 in höheren Konzentrationen eine statistisch auffällige bzw. signifikante Erhöhung des freien Anteils α von Calciumionen. Die Verdrängung von Calciumionen aus deren Bindung an RNS durch Kaliumchlorid ist statistisch nicht signifikant.

Es wird gefolgert, daß die herzglykosidartig wirkenden Bisguanylhydrazone BG 31 und BG 60 im Austausch gegen Calciumionen an Ribonukleinsäure gebunden werden. Die freigesetzten Calciumionen könnten für die positiv inotrope Wirkung dieser Substanzen mit verantwortlich sein.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Banerjee, K.C. and D.J. Perkins:

The interactions of some metal ions with deoxyribonucleic and ribonucleic acids in aqueous solution.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 61, 1 - 6 (1962)

Butler, J.A.V., B.E. Conway and D.W.F. James:

The effect of salts on polyelectrolyte interactions, with special reference to deoxyribonucleic acid.

Trans. Faraday Soc. 50, 612 - 623 (1954)

Chipperfield, D. and W.G. Nayler:

The effect of ouabain on calcium in subcellular fractions of cardiac muscle.

J. Pharmacol. exp. Ther. 170, 311 - 317 (1969)

Choi, Y.S. and C.W. Carr:

Ion-binding studies of ribonucleic acid and escherichia coli ribosomes.

J. Mol. Biol. 25, 331 - 345 (1967)

Cox, R.A. and U.Z. Littauer:

Ribonucleic acid from escherichia coli. III. The influence of ionic strength and temperature on hydrodynamic and optical properties.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 61, 197 - 208 (1962)

Dransfeld, H. und K. Greeff:

Der Einfluß des Prednison- und Prednisolonbisguanylhya-
zons auf die $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -stimulierte Membran-
ATPase des Meerschweinchenherzens.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.
249, 425 - 431 (1964)

Dransfeld, H., E. Galetke und K. Greeff:

Die Wirkung des Prednisolonbisguanylhya-
zons auf die $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -aktivierte Membran-ATPase des Herz-
und Skelettmuskels.

Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 166₂, 342 - 349 (1967)

Duhm, B., W. Maul, H. Medenwald, K. Patzschke, L. Wegner:

Verteilungsuntersuchungen mit Digitalis-ähnlichen
synthetischen Steroid-3,20-bisguanylhya-
zonen-¹⁴C.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1978 - 1981 (1969)

Dutta, S., S. Goswami, J.O. Lindower and B.H. Marks:

Subcellular distribution of digoxin- H^3 in isolated
guinea pig and rat hearts.

J. Pharmacol. exp. Ther. 159, 324 - 334 (1968)

Ehmer, A., K. Jahr, G. Kuschinsky, H. Lüllmann,

E. Mutschler und U. Wollert:

Über die Herzwirksamkeit einfacher Bisguanylhya-
zonen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 1273 - 1277 (1964)

Ehmer, A., K. Jahr, G. Kuschinsky, H. Lüllmann,
H. Reuter und U. Wollert:

Über die Herzglykosid-artige Wirkung von Progesteron-
bisguanylhydrazon (Progesteronbiguazon).

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac.

248, 521 - 539 (1964)

Felsenfeld, G. and A. Rich:

Studies on the formation of two- and three-
stranded polyribonucleotides.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 26, 457 - 468 (1957)

Felsenfeld, G. and S. Huang:

The interaction of polynucleotides with cations.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 34, 234 - 242 (1959)

Franke, J.:

Zur Isolierung von Ribonukleinsäure aus dem Kalbs-
herzen und über die Bindung von Herzglykosiden an
diese kardiale Ribonukleinsäure.

Dissertation, Mainz (1971)

Franke, J. und U. Wollert:

Isolation of ribonucleic acid from calfs' hearts
and the binding of cardiac glycosides to this RNA
(Über die Isolierung von Ribonukleinsäure aus Kalbs-
herzen und die Bindung von Herzglykosiden an diese
kardiale RNA).

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path.

274, R 37 (1972)

Gerber, H.-G., U. Fricke, W. Klaus und U. Wollert:

Über die intracelluläre Verteilung von ^3H -Digitoxin
im Meerschweinchenherzen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
260, 119 - 120 (1968)

Greeff, K., K. Meng und D. Schwarzmann:

Digitalis-ähnliche Eigenschaften des Prednison-
und Prednisolonbisguanylhydrazons. Ihre Wirkung
auf die Kaliumbilanz isolierter Herzpräparate
und den Na/K-Transport an Erythrozyten.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.
249, 416 - 424 (1964)

Grossman, A. and R.F. Furchgott:

The effects of frequency of stimulation and calcium
concentration on Ca^{45} exchange and contractility on
the isolated guinea-pig auricle.

J. Pharmacol. exp. Ther. 143, 120 - 130 (1964)

von Hattingberg, H.M., W. Klaus, H. Lüllmann und S. Zepf:

Fluorometrische Bestimmung von Mikromengen Calcium
in Muskelgewebe.

Experientia (Basel) 22, 553 - 555 (1966)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Die Verteilung des Progesteron-3,20-bisguanylhydrazon
und des Dodecandion-2,11-bisguanylhydrazon im
Meerschweinchenorganismus.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.
262, 484 - 494 (1969 a)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Die Verteilung des herzoglykosidartig wirkenden
3,3'-Dimethyl-4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon
im Meerschweinchenorganismus.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1845 - 1849 (1969 b)

Hofmann, P. und U. Wollert:

Über die subcelluläre Verteilung von 3,3'-Dimethyl-
4,4'-diacetyldiphenylbisguanylhydrazon im Meer-
schweinchenherzen.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.

263, 417 - 426 (1969 c)

Klaus, W. und G. Kuschinsky:

Über die Wirkung von Digitoxigenin auf den cellu-
lären Calcium-Umsatz im Herzmuskelgewebe.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.

244, 237 - 253 (1962)

Klotz, I.M. and J. Ayers:

Protein interactions with organic molecules.

Discuss. Faraday Soc. 13, 189 - 196 (1953)

Koller, S.:

Neue graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer
Zahlen.

4. Auflage, Steinkopff Verlag Darmstadt (1969)

Krieglstein, J. und G. Kuschinsky:

Quantitative Bestimmung der Eiweißbindung von
Pharmaka durch Gelfiltration.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 287 - 289 (1968)

Kroneberg, G. und K. Stoepel:

Synthetische Verbindungen mit Digitaliswirkung.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmacol.

249, 393-415 (1964)

Last, J.A.:

Studies on the binding of tetracycline to ribosomes.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 195, 506-514 (1969)

Lin, R.I-San and O.A. Schjeide:

Micro estimation of RNA by the cupric ion catalysed
orcinol reaction.

Analyt. Biochem. 27, 473-483 (1969)

Lüllmann, H. and W. Holland:

Influence of ouabain on an exchangeable calcium
fraction, contractile force, and resting tension
of guinea-pig atria.

J. Pharmacol. exp. Ther. 137, 186-192 (1962)

Miller Jr., R.G.:

Many-one t statistics.

in: Simultaneous statistical inference.

Mc Graw-Hill Book Company New York, p.76-81 (1966)

Repke, K., M. Est und H.J. Portius:

Über die Ursache der Speciesunterschiede in der
Digitalisempfindlichkeit.

Biochem. Pharmacol. 14₂, 1785-1802 (1965)

Riechert, M. und U. Wollert:

Über die Wechselwirkung herzwirksamer Substanzen
mit Ribonukleinsäure.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.

268, 148 - 160 (1971 a)

Riechert, M. und U. Wollert:

The influence of mono- and divalent cations on the
binding of small cationic molecules to ribonucleic
acid (Der Einfluß mono- und divalenter Kationen
auf die Bindung niedermolekularer kationischer
Substanzen an RNS).

Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.

270, R 114 (1971 b)

Rose, P.:

Dissertation, Mainz (1973)

Scatchard, G.:

The attractions of proteins for small molecules.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949)

Scholtan, W.:

Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an die
Serumeiweißkörper.

Makromol. Chem. 54, 24 - 59 (1962)

Scholtan, W.:

Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

4. Mitteilung : Konzentrations- und Temperaturab-
hängigkeit der Eiweißbindung.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 14, 1139 - 1146 (1964)

Scholtan, W.:

Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin
und Ribonucleinsäure.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 505 - 517 (1968)

Scholtan, W., K. Schlossmann und H. Rosenkranz:

Die Bindung von Steroidhormonen und von Steroid-
guanylhyaazonen an Serumalbumin.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 767 - 780 (1968)

Shack, J., R.-J. Jenkins and J.M. Thompson:

The interaction of ions and desoxypentose nucleic
acid of calf thymus.

J. Biol. Chem. 203, 373 - 387 (1953)

Shack, J. and B.S. Bynum:

Determination of the interaction of deoxyribo-
nucleate and magnesium ions by means of a metal
ion indicator.

Nature 184₁, 635 - 636 (1959)

Siebert, G.:

Subcelluläre Strukturen und ihre biologische
Funktion.

in: Molekularbiologie

Hrsg. von Th. Wieland u. G. Pfeleiderer

Umschau Verlag Frankfurt/M., 13 - 25 (1967)

Steiner, R.F. and R.F. Beers Jr.:

Titration and spectrophotometric studies upon
polyadenylic acid.

Nature 179₂, 1076 - 1077 (1957)

Steiner, R.F. and R.F. Beers Jr.:

The binding of molecules and ions by polynucleotides.
in: Polynucleotides

Elsevier Publishing Company Amsterdam, p.290 - 320 (1961)

Watanabe, I. and Y. Kawade:

Ultraviolet spectrophotometric study on highly
polymerized ribonucleic acid.

Proceedings of the IV. International Congress of
Biochemistry, Vol. XV, p. 35

Vienna: Pergamon Press Ltd. (1958)

Weinbach, W.Ch.:

Charakterisierung der Wechselwirkung aliphatischer
Bisguanylhydrazone mit Ribonukleinsäure.

Dissertation, Mainz (1971)

Wiberg, J.S. and W.F. Neuman:

The binding of bivalent metals by deoxyribonucleic
and ribonucleic acids.

Arch. Biochem. Biophys. 72, 66 - 83 (1957)

Wollert, U.:

Pharmakologische Eigenschaften von Mono- und
Bisguanylhydrazonen.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 680 - 683 (1969)

Zubay, G.:

A three-stranded polyribonucleotide structure.

Nature 182₁, 388 - 390 (1958)

Zubay, G.:

The interaction of nucleic acid with Mg - ions.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 32, 233-236 (1959)

Zubay, G. and P. Doty:

Nucleic acid interactions with metal ions and
amine acids.

Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 29, 47-58 (1958)

Für die freundliche Hilfe und Ratschläge bei der Durchführung der Versuche möchte ich Frl. W. Krauss und Frau K. Lemmel meinen besten Dank aussprechen. Ebenso danke ich Frau H. Steinbrunn für die angefertigten Photographien.

L E B E N S L A U F

Am 26. Februar 1944 wurde ich, Volker Michael Karlheinz Martynus, in Breslau/Niederschlesien geboren. Im Jahr 1945 kamen meine Mutter und ich auf der Flucht vor den Russen nach Berg, Kreis Hof-Saale, wo mein Vater die dortige Arztstelle übernehmen konnte. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Berg wechselte ich in die Oberrealschule Hof und legte am 22. Juli 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964/65 studierte ich Physik und Chemie in Mainz und ließ mich im Sommersemester 1965 in die medizinische Fakultät umschreiben. Am 5.10.1965 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 14.2.1969 die ärztliche Vorprüfung und am 5.2.1973 legte ich das Medizinische Staatsexamen ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich mit meiner Dissertation im Pharmakologischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und vom 15.2. bis 15.5.1973 habe ich dort als Medizinalassistent gearbeitet.

Vom 1. Juni bis 30. September 1973 war ich auf der chirurgischen und urologischen Abteilung, vom 1. Oktober 1973 bis 28. Februar 1974 auf der internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Groß-Gerau als Medizinalassistent tätig.

